

文章编号:1001-6880(2014)3-0431-07

响应面法优化超声提取毛花猕猴桃根中三萜类化合物的工艺研究

林水花¹,吴建国²,郑燕枝¹,吴岩斌²,邹秀红³,吴锦忠^{1*}¹福建中医药大学药学院; ²福建中医药大学中西医结合研究院,福州 350108; ³福建省永春县林业局,永春 362600

摘要:以毛花猕猴桃根为原料,乙醇为提取溶剂,超声辅助提取三萜类化合物,考察从毛花猕猴桃根中提取总三萜的最佳工艺。选取乙醇浓度、料液比、超声波功率和提取时间4个因素,通过单因素实验选取影响因素的水平,然后采用四因素三水平的响应面分析法(RSA)进行预测和分析,获得最佳优化条件为:乙醇浓度72%,料液比1:20 g/mL,超声功率400 W,提取时间45 min,验证实验结果为12.65 mg/g,理论值与实际值接近。实验结果表明,根据Box-Behnken中心组合设计试验结合响应面分析法可以较好的对毛花猕猴桃根中总三萜的提取工艺进行优化。

关键词:毛花猕猴桃;三萜类化合物;超声波提取工艺;响应面分析

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Optimization of Ultrasonic Extraction of Triterpenoid from the Root of *Actinidia eriantha* by Response Surface Analysis

LIN Shui-hua¹, WU Jian-guo², ZHENG Yan-zhi¹, WU Yan-bin², ZOU Xiu-hong³, WU Jin-zhong^{1*}¹Fujian University of Traditional Chinese Medicine; ²Academy of Integrative MedicineFujian China, Fuzhou 350108, China; ³Forestry bureau of Yongchun Fujian province, Yongchun 362600, China

Abstract: The objective of this study was to optimize the ultrasonic-assisted extraction of total triterpenoid from the root of *Actinidia eriantha*. Four factors, namely ethanol concentration, ratio of solvent to material, ultrasonic power and extraction time, were selected for the method optimization. Based on single factor experiments, the conditions of ultrasonic-assisted extraction for total triterpenoid from the root of *A. eriantha* was optimized through response surface analysis (RSA) with four factors and three levels. The optimal extraction conditions were obtained as follows: 72% as ethanol concentration, 1:20 g/mL as material-liquid ratio, 400 W as ultrasonic power, 45 min as extraction time. Under these conditions, the extraction yield of triterpenoid was determined to be 12.65 mg/g in the confirmatory experiment, which was close to the theoretical value. Hence, the ultrasonic extraction of triterpenoid extracted from the root of *A. eriantha* was successfully optimized by RSA.

Key words: *Actinidia eriantha* Benth.; triterpenoid; ultrasonic extraction; response surface analysis

毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.),又名白毛桃、毛冬瓜、白藤梨,其根、根皮和叶均可入药,主要分布在浙江、江西、福建、湖南等地,资源丰富。民间用其根治疗肺热失音,大头瘟,湿热带下,乳痈,胃癌,鼻癌,乳癌等^[1]。研究表明毛花猕猴桃根主要含有三萜类等化学成分^[2,3],具有广泛的生物活性如抗炎、抗肿瘤等^[4],三萜类化合物的抗肿瘤作用机制也多种多样,如抑制肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤血

管生成,抑制肿瘤细胞端粒酶活性等^[5]。

超声提取方法是一种新技术,具有低温、高效、能够节省溶剂等优点,有利于提取不受热和不稳定的成分^[6]。本文采用超声辅助提取的方法,根据单因素考察结果结合响应面分析法对毛花猕猴桃根中的总三萜提取工艺进行优化,为毛花猕猴桃根的进一步开发与研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药材与试剂

毛花猕猴桃根采自福建永春药材市场,经福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定为猕猴桃科植

物毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.)的根。乙醇、高氯酸(天津福晨化学试剂厂)和香草醛、冰乙酸(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯;熊果酸标准品购自中国药品生物制品检定所(批号:110742-200517)。

1.2 仪器与设备

LK-1000A 摆摆式中药粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司);SFG-02B 电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司);AB204-N 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);DLSD-5/20 低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线绘制

精密称取熊果酸标准品 2.5 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯溶液溶解并定容至刻度,摇均,配置成含熊果酸 0.25 mg/mL 的对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 置于 10 mL 容量瓶中,水浴加热,除去溶剂后加入 0.5 mL 5% 香草醛-冰乙酸及 1.2 mL 高氯酸,混匀,密塞,置 70 °C 恒温水浴加热 15 min,取出冰浴冷却至室温,乙酸乙酯定容,摇均。以相应试剂溶液为空白对照,于 550 nm 测定吸光值,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线得 $Y = 0.07465X + 0.02193, R^2 = 0.99995$ 。结果表明,三萜酸在浓度为 5.0 μg/mL 至 17.5 μg/mL 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

1.3.2 样品制备及含量测定

准确称取毛花猕猴桃根粉末 10.0 g,乙醇超声提取,回收溶剂,提取液在水浴锅上干燥至恒重。精密称取干燥至恒重提取物 10 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL,提取物溶液浓度为 0.4 mg/mL。按标准曲线绘制方法进行三萜酸含量测定,计算毛花猕猴桃根中总三萜的含量(mg/g)。

1.3.3 方法学考察

1.3.3.1 精密度实验

分别精密量取熊果酸对照品溶液 0.3 mL 及提取物溶液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中。按 2.6 方法测定总三萜含量,分别连续测量 6 次。总三萜含量的 RSD 分别为 1.80% 和 1.90%,表明仪器精密度良好。

1.3.3.2 稳定性实验

分别精密量取熊果酸对照品溶液 0.3 mL 和提取物溶液 1 mL,于 10 mL 容量瓶中。按 1.3.1 方法操作,分别于 0、15、30、45、60、75、90 min 测定吸光度值。总三萜含量的 RSD 分别为 1.37% 和 1.38%,表明样品在 90 min 内稳定。

1.3.3.3 重复性实验

精密称取药材粉末 2 g,共 6 份,分别加入 30 mL 75% 的乙醇溶液,浸泡 20 min,超声提取 45 min,提取功率 500 W。提取两次,过滤,合并提取液,再按 1.3.1 项下操作,测定吸光度值。总三萜含量的 RSD 为 3.29%,表明方法重复性好。

1.3.3.4 加样回收率实验

精密称取同一批药材粉末 6 份,每份 0.5 g,分别加入熊果酸对照品 4.0 mg,7.5 mL 75% 的乙醇溶液,浸泡 20 min,超声提取 45 min,提取温度 40 °C,提取功率 500 W。提取两次,过滤,合并提取液,按 1.3.1 项下操作,测定吸光度值。总三萜含量的 RSD 为 4.27%,表明方法准确度良好。

1.3.4 超声波辅助提取三萜类化合物的单因素实验

1.3.4.1 乙醇浓度考察

精密称取药材粉末 10.0 g,共 5 份,分别加入 150 mL 乙醇溶液,乙醇浓度分别为 15%、35%、55%、75%、95%。浸泡 20 min,超声提取 45 min,提取功率为 500 W。提取两次,提取液过滤,合并滤液,浓缩,水浴锅蒸干,得到样品提取物。

1.3.4.2 料液比考察

分别精密称取粉末 10.0 g,共 5 份,分别加入 100、150、200、250、300 mL 75% 的乙醇溶液。浸泡 20 min,超声提取 45 min,提取功率 500 W。提取两次,提取液过滤,合并浓缩,水浴锅蒸干,得到样品提取物。

1.3.4.3 提取功率考察

精密称取药材粉末 10 g,共 5 份,分别加入 150 mL 75% 的乙醇溶液。浸泡 20 min,超声提取 45 min,提取功率分别为 120、200、300、400、500 W。提取两次,提取液过滤,合并浓缩,水浴锅蒸干,得到样品提取物。

1.3.4.4 提取时间考察

精密称取药材粉末 10 g,共 5 份,每份分别加入 150 mL 75% 乙醇溶液。浸泡 20 min,分别超声提取 15、30、45、60、75 min,提取功率为 500 W。提取两

次,提取液过滤,合并浓缩,水浴锅蒸干,得到样品提取物。

1.3.5 响应面分析法优化超声波辅助提取三萜类化合物的工艺参数

根据单因素实验结果,确定总三萜的影响因素,分别为乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取功率(D),选取总三萜得率较高的三组数据,运用Design-Expert8.05软件程序根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理,采用四因素三水平的响应面分析法,以总三萜的提取得率为响应值作响应面,对提取条件进行优化。因素与水平的实验设计见表1。

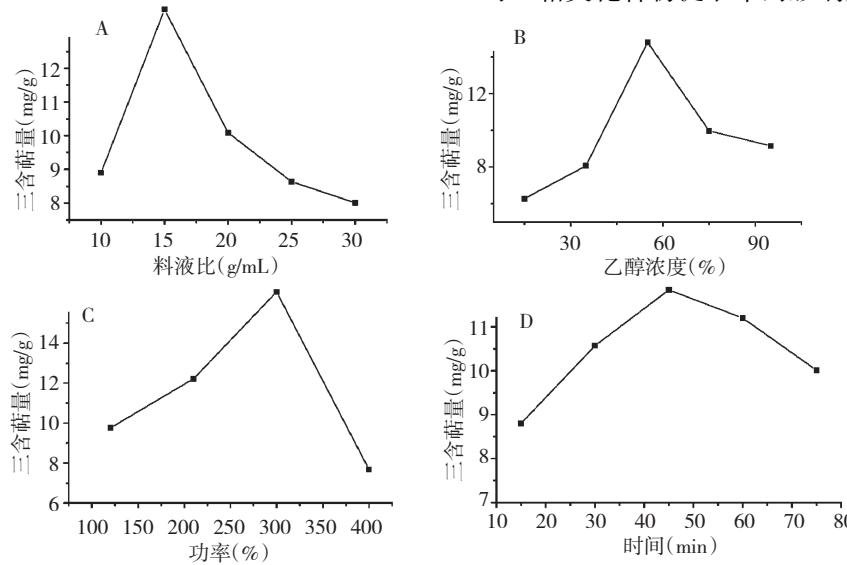


图1 料液比(A)、乙醇浓度(B)、超声功率(C)及提取时间(D)对总三萜提取的影响

Fig. 1 Effect of material-solvent ratio (A), ethanol concentration (B), ultrasonic power (C) and extraction time (D) on extraction yield of triterpenoid

2.2 响应面分析法优化

2.2.1 响应面分析因素水平的选择

根据Box-behnken中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,选取乙醇体积分数、料液比、超声波功率和提取处理时间进行4因素3水平实验设计,利用Design-Expert软件进行数据拟合,实验因

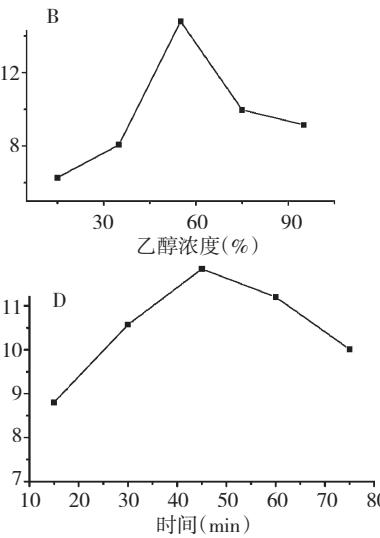
表1 响应面分析因素和水平
Table 1 Factors and levels of RSA

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%) Ethanol concentration	35	55	75
B 料液比(g/mL) Ratio of solvent to material	1:10	1:15	1:20
C 提取时间(min) Extraction time	30	45	60
D 超声波功率(W) Ultrasonic power	200	300	400

2 结果与分析

2.1 单因素考察实验结果

乙醇体积分数、料液比、超声波功率、提取时间对三萜类化合物提取率的影响见图1。



素和水平见表1。

以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时(C)和间超声波功率(D)为自变量,三萜类化合物的提取率(Y)为响应值,进行响应面分析实验,实验方案及实验结果见表2。

表2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Design and experimental results of RSA

实验序号 No.	A (%)	B (g/mL)	C (min)	D (W)	三萜含量 Content (mg/g)	
					实际值 Actual Value	预测值 Predicted value
1	1	0	-1	0	11.154	11.511
2	0	-1	0	1	10.904	11.016

3	0	-1	1	0	9.091	9.594
4	1	0	0	-1	11.554	11.727
5	0	0	-1	1	11.507	11.261
6	0	0	0	0	10.302	11.369
7	0	0	0	0	11.787	11.369
8	1	1	0	0	12.615	12.196
9	0	1	0	1	12.639	12.728
10	0	0	1	-1	10.43	10.159
11	0	0	1	1	12.46	11.956
12	-1	0	-1	0	7.743	8.005
13	1	0	0	1	12.55	12.809
14	-1	0	1	0	9.381	9.077
15	0	1	1	0	10.17	10.955
16	-1	0	0	-1	8.574	8.779
17	0	0	0	0	11.787	11.369
18	-1	1	0	0	9.767	9.410
19	0	1	-1	0	10.705	10.665
20	-1	-1	0	0	8.295	8.197
21	0	0	0	0	12.535	11.369
22	1	-1	0	0	10.934	10.774
23	0	-1	-1	0	9.713	9.391
24	0	-1	0	-1	10.097	10.062
25	0	0	0	0	10.435	11.369
26	1	0	1	0	11.142	10.933
27	-1	0	0	1	10.103	10.394
28	0	1	0	-1	11.043	10.985
29	0	0	-1	-1	10.374	10.361

2.2.2 模型的建立及其显著性检验

Design-Expert 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合得到三萜得率对乙醇浓度、料液比、提取时间、提取功率的二次多项回归模型:

$$Y = -10.63 + 0.35 \times A + 0.54 \times B + 0.33 \times C - 0.02 \times D + 5.225 \times 10^{-4} \times A \times B - 1.375 \times 10^{-3} \times A \times C - 6.66 \times 10^{-5} \times A \times D + 2.9 \times 10^{-4} \times B \times C + 3.95 \times 10^{-4}$$

$$\times B \times D + 1.50 \times 10^{-4} \times C \times D - 1.87 \times 10^{-3} \times A^2 - 0.02 \times B^2 - 3.29 \times 10^{-3} \times C^2 + 3.05 \times 10^5 \times D^2$$

Y 为总三萜含量, A、B、C、D 分别为乙醇浓度、料液比、提取时间、提取功率。总三萜含量的预测响应值可从二次多项式方程中的自变量值中获得。对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

表 3 总三萜提取率的方差分析表

Table 3 AVONA of extraction of triterpenoid from *A. eriantha*

Source	Sum of squares	df	Mean square	F Vaule	P-value Prob > F
A	21.563	1	21.563	50.296	< 0.0001
B	5.207	1	5.207	12.146	0.0036
C	0.182	1	0.182	0.425	0.5252
D	5.455	1	5.455	12.725	0.0031
AB	0.011	1	0.011	0.025	0.8755

AC	0.680	1	0.681	1.588	0.2283
AD	0.071	1	0.071	0.166	0.6902
BC	0.002	1	0.002	0.004	0.9480
BD	0.156	1	0.156	0.363	0.5565
CD	0.201	1	0.201	0.469	0.5045
A2	3.624	1	3.624	8.453	0.0115
B2	1.478	1	1.478	3.447	0.0845
C2	3.554	1	3.554	8.290	0.0121
D2	0.605	1	0.605	1.411	0.2546
Model	42.292	14	3.021	7.046	0.0004
Residual	6.002	10	0.429		
Lack of fit	2.282	4	0.228	0.245	0.9674
Pure error	3.720	28	0.930		
Cor total	48.294				
$R^2 = 0.876$		$R^2 \text{ Adj} = 0.751$	$CV = 6.129$	$\text{Adeq precision} = 10.200$	

从表 3 分析可知,该模型 F 值等于 7.046 且“Prob > F”小于 0.05 说明拟合的模型高度显著。失拟项是模型中数据的变异,失拟项的 F 值和 P 值分别为 0.245 和 0.967,说明失拟项不显著,该回归方程无失拟因素存在,回归模型与实测值能较好的拟合。 $R^2\text{Pre}$ 为 0.607 和 $R^2\text{Adj}$ 为 0.751 均在合理的

范围内,信噪比为 10.200,表示该模型有足够的信号。以上均说明该模型可用于优化总三萜提取工艺设计。

2.2.3 响应曲面分析

根据回归方程,做出的响应面和等高线图,是特定的响应面 Y(总三萜的提取率)对应的因素 A、B、

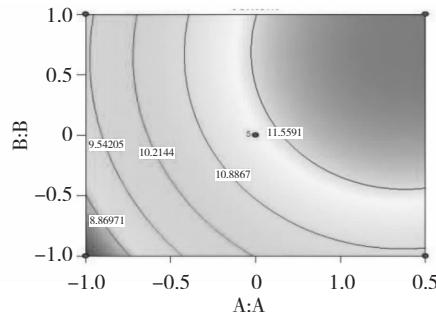
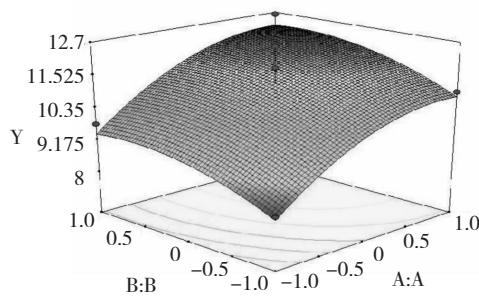


图 2 乙醇浓度(A)和料液比(B)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour plot showing the effect of A and B on extraction yield of triterpenoid

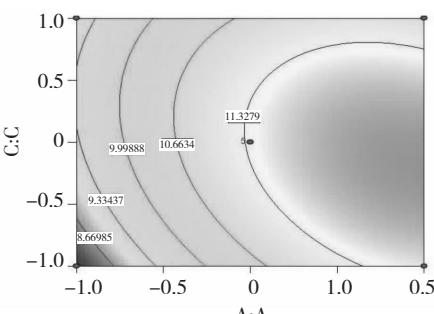
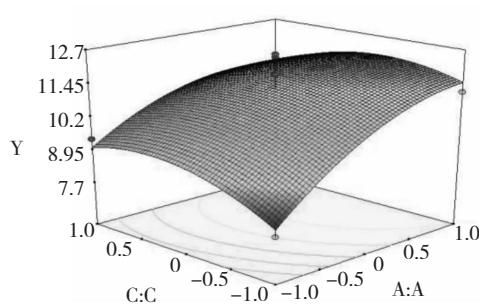


图 3 乙醇浓度(A)和提取时间(C)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 3 Response surface plot and contour plot showing the effect of A and C on extraction yield of triterpenoid

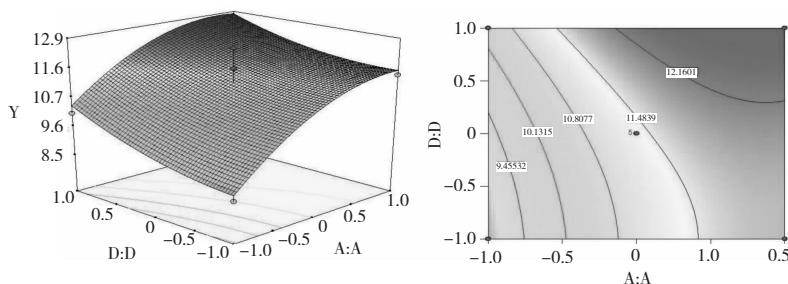


图4 乙醇浓度(A)和提取功率(D)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot showing the effect of A and D on extraction yield of triterpenoid

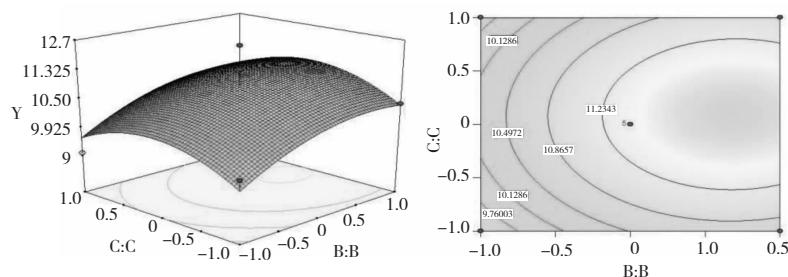


图5 料液比(B)和提取时间(C)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 5 Response surface plot and contour plot showing the effect of B and C on extraction yield of triterpenoid

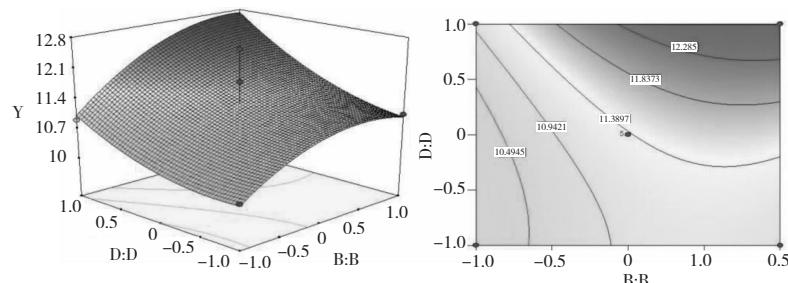


图6 料液比(B)和提取功率(D)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot showing the effect of B and D on extraction yield of triterpenoid

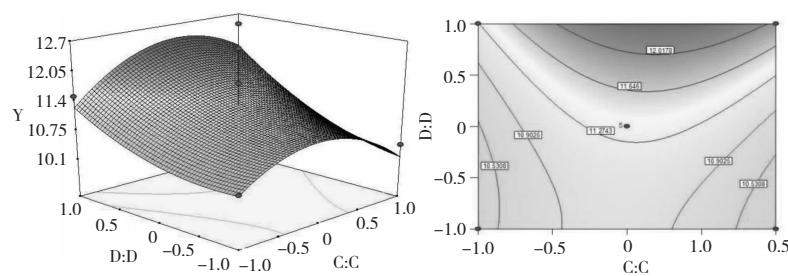


图7 提取时间(C)和超声功率(D)对总三萜提取影响的响应面和等高线图

Fig. 7 Response surface plot and contour plot showing the effect of C and D on extraction yield of triterpenoid

C、D 构成的一个三维空间在二维平面上的等高图，可直观反映各因素对响应值的影响。等高线的形状可反映出交互效应的强弱，椭圆形表示两因素交互作用显著，而圆形则与之相反。

2.3 总三萜的最优工艺条件与验证

Design-Expert 软件分析处理，结果表明，从毛花猕猴桃根中超声提取总三萜的最优条件为：乙醇浓度 71.72%，料液比 1:20 (g/mL)，提取时间 45.24

min, 提取功率 400 W。总三萜的含量 13.26 mg/g。考虑到实际操作条件, 将毛花猕猴桃根三萜提取的最佳工艺调整为: 乙醇浓度 72%, 料液比 1:20 (g/mL), 提取时间 45 min, 提取功率 400 W。依据调整后的条件进行验证实验, 重复三次, 得到总三萜含量平均值为 12.65 mg/g, 实际值与理论预测值的相对误差为 4.60%, 实际值与理论值非常接近, 说明该方程与实际情况拟合良好。

3 讨论

近年来, 超声波辅助提取结合响应面分析法在优化黄酮^[7]、三萜^[8]、皂苷^[6]、多糖^[9]、多酚^[10]等天然有效成分的提取工艺中得到了广泛应用。与传统的正交设计实验相比, 响应面分析法能够更好地反映多种实验因素间的交互作用, 并在给出的区域上找到因素和响应值之间的回归方程, 进行精确回归分析, 从而优选到最佳的考察因素值。

毛花猕猴桃根中总三萜的提取工艺研究还未见报道, 因此本实验采用超声波辅助提取的方法结合响应面分析首次对毛花猕猴桃根中的总三萜超声提取条件进行了优化考察, 实验结果显示, 乙醇浓度对总三萜的超声提取影响极其显著, 料液比和超声功率对总三萜提取的影响也非常显著。实验结果得到的回归模型显著, 失拟误差不显著, 说明通过本实验所建立的二次回归方程能较好的描述各因素和响应值之间的关系, 该模型显著可靠, 较好的优化了从毛花猕猴桃根中提取总三萜的工艺, 得到的最佳提取条件为乙醇浓度 72%, 料液比 1:20 g/mL, 超声波功率 400 W, 提取时间 45 min。该方法不但操作简单, 耗时短, 提取效率高, 而且在较低温条件下进行, 避免了对提取物有效成分的破坏, 因此, 可广泛应用于毛花猕猴桃根中总三萜的提取。

参考文献

1 The National Assembly of Chinese Herbal Medicine (全国中

草药汇编). Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 142.

- 2 Huang CS(黄初升), Zhang ZX(张壮鑫), Li GS(李干孙), et al. Two new triterpenoid compounds in the root of *Actinidia eriantha* Benth. *Plant Diver Res* (云南植物研究), 1988, 10:93-100.
- 3 Bai SP(白素平), Huang CS(黄初升), Chen XH(陈希慧). Triterpenoid chemistry research of *Actinidia eriantha* Benth. . *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1997, 9:15-17.
- 4 Ding Y, Liang C, Kim JH, et al. Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuricum* and their anti-inflammatory activity. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2010, 20:1528-1531.
- 5 Song CC(宋长城), Zhu ML(朱美玲). Antitumor activity and mechanism research of triterpene compound in traditional Chinese medicine. *J Mod Oncol* (现代肿瘤医学), 2011, 9: 1880-1883.
- 6 Hu T, Guo YY, Zhou QF, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total saponins from *Eclipta prostrata* L. using response surface methodology. *Food Sci*, 2012, 9: C975-C982.
- 7 He WQ(贺伟强), Xiang TY(向天勇), Tao K(陶昆), et al. Optimization of technology for ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from Mulberry leaves by response surface methodology. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2012, 28:296-301.
- 8 Yu XF(于小凤), Qin QL(秦庆玲), Li F(李峰), et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total triterpenoid from *Phellinus igniarius* by response surfaces methodology. *Chin Pharm*(中国药房), 2012, 23:4455-4457.
- 9 Zhang Y(张颖). Study to extraction process optimization of rhubarb polysaccharide with response surface. *China Mod Doc* (中国现代医生), 2012, 50:99-103.
- 10 Xu XQ(徐秀泉), Li F(李峰), Tang J(汤建), et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 114-117.
- 11 State Environmental Protection Agency(国家环境保护局). List of rare and endangered plants of China (中国珍稀濒危保护植物名录). *Bull Biol*(生物学通报), 1987, 7:26.
- 12 Kang WY, Song SL, Zhang L. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. . *Med Chem Res*, 2011, 20:809-816.

(上接第 413 页)

- 9 Gao RM(高润梅), Shi XD(石晓东), Yang P(杨鹏). Studies on the Seed Characteristics of Sparse Flower *Kolkwitzia amabilis* Graebn. *Seed*(种子), 2005, 24(7):34-36.
- 10 Ji H(济华). Ornamental Tree Science(观赏树木学). Chinese Agricultural Press, 1990.